

普通小麦线粒体蛋白质的双向电泳分析

司智海 刘植义

(河北师范大学生物系,石家庄)

提 要

采用改良的 IEF-SDS 双向电泳技术对普通小麦 (*T. aestivum* L.) 线粒体蛋白质进行了分析。电泳结果表明: 改良后的电泳系统稳定性和重复性较好, 并且分辨率较高; 考马斯亮蓝染色图谱中线粒体多肽呈现 150—180 个斑点; 本文还就一些技术理论等问题进行了讨论。

关键词 普通小麦, 线粒体蛋白质, 双向电泳

双向电泳技术以其高分辨率倍受人们青睐, 自 O'Farrell^[1]发明这种技术以来, 已得到了广泛的应用。利用这种分析方法, 许多人已在膜蛋白双向电泳上做了不少尝试, 取得了不少经验^[2-4]。尤以 Ames(1976)^[2]的 SDS-NP-40-尿素系统效果最好。目前植物膜蛋白特别是线粒体蛋白方面的工作尚不够深入。在前人工作的基础上, 我们采用双向电泳技术对普通小麦线粒体蛋白质进行了分析, 效果较好, 现介绍如下。

材 料 和 方 法

1. 试剂和药品

丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、TEMED 为 Bio-Rad 产品; 载体两性电解质 (Pharmalyte) 及标准分子量蛋白质购自 Pharmacia Fine Chemicals; NP-40 为 Fluka 产品; 其它试剂均为进口分装或国产分析纯、优级纯试剂。

2. 黄化幼苗线粒体的制备及纯化

五天龄的小麦黄化幼苗线粒体以 Day 法制备^[5], Douce 的密度梯度法纯化^[6,7]。

3. 蛋白质定量

按 Bradford 的方法进行^[7]。

4. pH 梯度曲线的制作

第一向等电聚焦完毕后, 将胶柱打出, 切成 1cm 长小段。分别放入各装有 0.5ml 经真空脱气的重蒸水的试管中。于室温下放置 18—24h, 测定每管溶液的 pH 值。以胶长为横坐标, pH 值为纵坐标作图。每一小段所对应的胶长按 $(n - 0.5)$ cm 计算, 其中 n 为每一小段胶所处的段数。

5. 双向电泳

按 O'Farrell^[1]和 Ames^[2]的方法进行并做如下修改:

(1) 样品处理: 取 20 μ l 样品(约 60—100 μ g 蛋白)加 20 μ l SDS 混合液(0.1mol/L Tris-HCl pH6.8, 4% SDS<W/V>, 2% 巯基乙醇<V/V>)于沸水浴中加热 3—4min。冷却后加入 60mg 尿素和 40 μ l 20% <W/V> NP-40, 于室温下混合 10min, 然后就可用于上样。

(2) 第一向等电聚焦电泳: 载体两性电解质浓度为 2.8% Pharmalyte (pH3—10: pH2.5—5: pH5—8 = 1:1:1); 覆盖液为 8mol/L 尿素。按 200V, 10min、300V, 30min 和 400V, 10min 进行预电泳。加样后 400V 稳压电泳 13—16h, 停止电泳前升压至 500V 持续 1h。

(3) 平衡: 于平衡液中室温下放置 10—15min 即可。

(4) 第二向 SDS-PAGE; 连接用琼脂以 0.125mol/L Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS (W/V) 配制。采用 Laemmli 系统^[8]; 浓缩胶高与第一向电泳胶柱直径比为 4:1 左右。

(5) 凝胶的染色及脱色^[9]: 第二向电泳完毕后, 将胶板置于染色液(0.1% 考马斯亮蓝 R 250、47.5% 乙醇、10% 冰醋酸、0.2% 硫酸铜)中于 40°C 下染色 30min, 然后用 25% 甲醇、7.5% 冰醋酸脱色至背景透明。

结果与讨论

1. 稳定性

第一向等电聚焦电泳的 pH 梯度会影响整个系统的功能。pH 范围过窄, 可能会失去许多蛋白质, 过宽则会使蛋白质得不到有效分离。根据 Gianazza (1980) 对 800 多种蛋白质的 pI 值的统计, 大部分蛋白质的 pI 值介于 pH 4~7 之间^[10]。因此, 设计实验时就要求第一向等电聚焦电泳的 pH 梯度稳定在这个范围内, 以使大部分蛋白质得到较好分离。在本实验条件下测得的 pH 梯度如图 1, 由图中可看出 pH 梯度在 pH 3.8~6.7 之间呈直线。这说明载体两性电解质的配比和浓度是比较合适的。

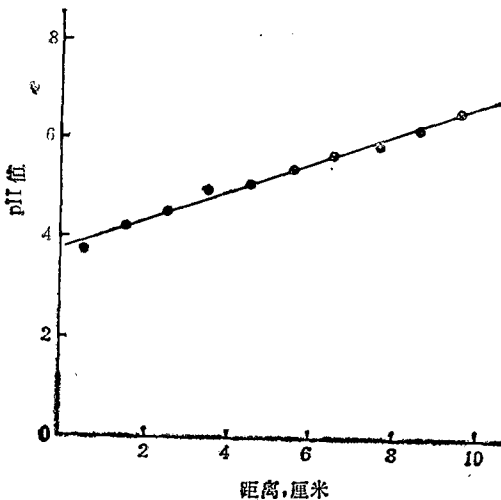


图 1 第一向等电聚焦电泳的 pH 梯度曲线
横坐标的零点是凝胶的底部

采用 Laemmli 系统进行第二向 SDS-PAGE, 其标准分子量蛋白质 lgMW-R_f 曲线

如图 2, 结果说明第二向 SDS-PAGE 也是符合分析要求的。

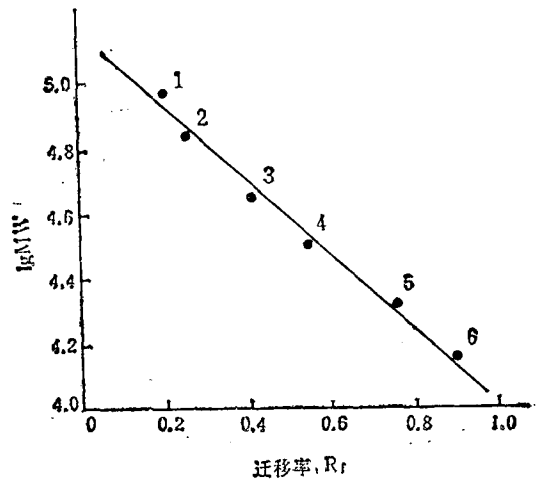


图 2 第二向 SDS-PAGE 的标准分子量蛋白质 lgMW-R_f 曲线

1. 磷酸化酶: 94kD; 2. 牛血清白蛋白: 67kD; 3. 卵清蛋白: 43kD; 4. 碳酸酐酶: 30kD; 5. 胰蛋白酶抑制剂: 20.1kD; 6. α-乳清蛋白: 14.4kD

多次实验结果表明, 这个分析系统的稳定性较高, 重复性良好。

2. 分辨率

Diano^[3] 在对玉米线粒体蛋白质分析时直接采用了 O'Farrell 的方法, 结果在上样 50—100μg 蛋白时用考马斯亮蓝 R 250 染色最多可分辨出 129 个蛋白斑点, 当上样量增至 250μg 时才可分辨出 143 个斑点。在改良的分析系统中若上样量在 60—100μg 蛋白时, 一般情况下可分辨出 150—180 个斑点, 最高时可达 200 多个斑点, 并且蛋白斑点清晰, 相互重叠现象很少(图 3)。这样更便于对比分析, 提高辨别差别的能力。利用这个系统我们对小麦 T 型不育系和保持系孕穗期线粒体多肽进行了分析, 结果发现了明显差别(另文报道)。

3. 关于一些技术理论问题的讨论

理论研究认为, 高浓度 NP-40 的存在有利于等电聚焦过程中 SDS 从蛋白质上脱去^[10]。在样品增溶时, Ames 采用 NP-40:SDS = 8:1 的比率。经过实验我们发现当 NP-40:SDS = 12.5:1 时电泳效果较好, 因此我们就采用了这个比例。这至少说明 NP-40:SDS 在 8:1 和

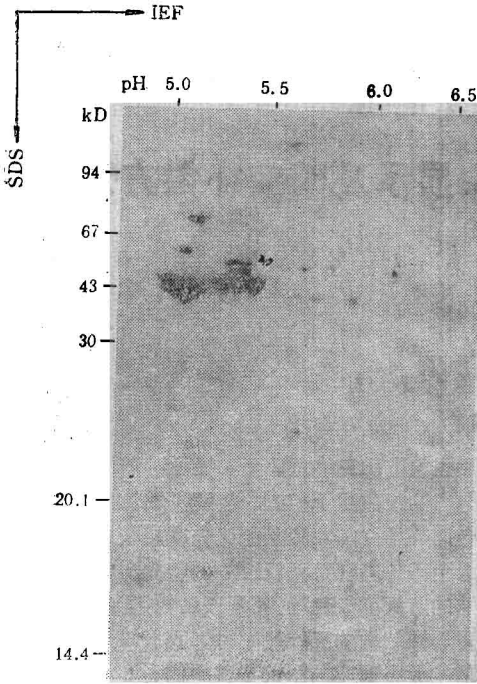


图3 普通小麦黄化幼苗线粒体多肽的双向 IEF-SDS 图谱 12.5:1 之间都是可行的,至于何种比率最合适,有待于进一步的研究。

实验中,我们还发现除第一向等电聚焦的 (上接第66页)

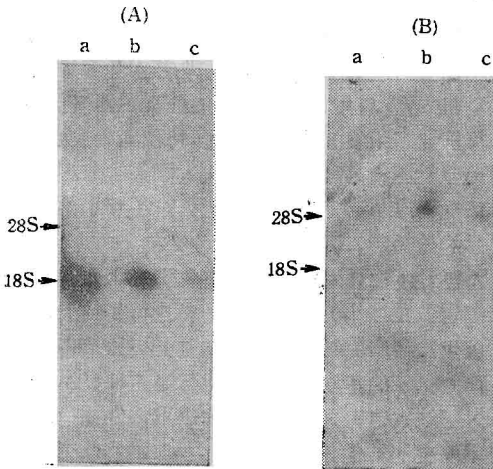


图4 RNA制品的 Northern 印迹杂交分析 来自于30天(a),40天(b)和50天(c)的总RNA 经电泳、转移、与 β -actin 探针(A)和一基因探针 (B)杂交的放射自显影

RNA分离制备的成功,关键在于消除RNA 酶活性。本方法由于从一开始样品就置于4mol/L 异硫氰酸胍和 β -巯基乙醇中,使得RNA 酶

效果会影响第二向电泳结果中蛋白质斑点的形状外;第二向电泳浓缩胶的长度与第一向胶柱直径的比例也会影响其形状。经验表明,在本实验条件下这个比例为4:1时,蛋白质斑点呈椭圆形,可达到提高分辨率的目的。

在凝胶染色问题上,为避免载体两性电解质的干扰,采用考马斯亮蓝法时可在染色液中加入一定浓度的硫酸铜^[9]。实验表明效果确实明显,但原理目前还不清楚。

参 考 文 献

- 1 O'Farrell P H. *J Bio Chem*, 1975; 2250(10): 4007
- 2 Ames G F L *et al. Biochemistry*, 1976; 15(3): 616
- 3 Diano M. *Plant Physiol.*, 1982; 69: 1217
- 4 Hurkman W J *et al. Plant Physiol*, 1986; 81: 802
- 5 Day D A' *et al. Plant Science Letters*, 1977; 11: 99
- 6 Douce R *et al. Biochem Biophy Acta*, 1972; 275: 148
- 7 Bradford M M. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248
- 8 Laemmli U K. *Nature*, 1970; 227: 680
- 9 Osterman L A. *Methods in Protein and Nucleic Acid Research*. Springer-Verlag, 1984; (1), 180
- 10 Pharmacia Fine Chemicals AB. *Isoelectric Focusing*, 1982
- 11 Bravo R. In: Celis J E *et al eds, Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins*, London: Academic Press Inc, 1984: 3

[本文于1988年11月29日收到]

处于失活状态,直到最后一步。因此没有特殊的要求来保护RNA 以防降解,这就省去了在常规RNA 制备法中对许多试剂和器皿要求特殊处理的不便。同时,在采样过程中即用了快速冰冻,降低并抑制了内源性RNA 酶的活性。因此本法成功率较高,操作简便,我们认为它是一种较好的RNA 制备方法,值得推广。

杨友云同志收集部分人胚,郭文君同志提供组织培养细胞,黄培宇同志协助照片拍摄与印制,在此一并致谢。

参 考 文 献

- 1 Chirgwin J M *et al. Biochemistry*, 1979; 18: 5294
- 2 Chomczynski P, Sacchi N. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156
- 3 Procz M *et al. Hemoglobin*, 1982; 6: 27
- 4 Maniatis T *et al. Molecular cloning—A laboratory manual*. New York: CSH, 1982: 202
- 5 Aviv H *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1972; 69: 1408
- 6 Meinkoth J, Wahl G. *Anal Biochem*, 1984; 138: 267

[本文于1988年10月12日收到]